



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap

Institutionen för biomedicin och veterinär
folkhälsvetenskap

TRÄNING, BIOMARKÖRER OCH OSTEOARTRIT HOS HÄST

**Kan man monitorera träningens effekter på ledbrösket
genom att mäta biomarkörer i blod eller ledvätska?**

**Training, Biomarkers and Osteoarthritis in the
horse – can you monitor the effects of training on
articular cartilage by measuring biomarkers in serum and
synovial fluid?**

*Gry Martineau
Uppsala
2019*

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen, 15hp

Träning, Biomarkörer och Osteoartrit hos häst – kan man monitorera träningens effekter på ledbrösket genom att mäta biomarkörer i blod och ledvätska?

Training, Biomarkers and Osteoarthritis in the horse – can you monitor the effects of training on articular cartilage by measuring biomarkers in serum and synovial fluid?

Gry Martineau

Handledare: *Eva Skiöldebrand, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, enheten för patologi*

Examinator: *Maria Löfgren, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kursansvarig institution: Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Kurskod: EX0862

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2019

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: *Träning, biomarkörer, osteoartrit, ledhälsa, hästar*

Key words: *Training, exercise, biomarkers, osteoarthritis, joint health, horses*

**Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences**

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

INNEHÅLL

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning	3
Material och metoder	3
Litteraturoversikt	3
Ledens fysiologi	3
<i>Ledkapseln</i>	4
<i>Ledvätskan</i>	4
<i>Subkondralt ben</i>	4
<i>Ledbrosk</i>	5
Osteoartrit	7
Biomarkörer	7
<i>Aggrekan</i>	8
<i>Kollagen</i>	8
<i>COMP</i>	9
Träning	9
<i>Aggrekan</i>	9
<i>Kollagen</i>	10
<i>COMP</i>	10
Diskussion	11
<i>Aggrekan</i>	12
<i>Kollagen</i>	12
<i>COMP</i>	13
Slutsats	13
Litteraturförteckning	15

SAMMANFATTNING

Osteoartit (OA) hos häst är en av de vanligaste orsakerna till varför tävlingshästar måste gå i pension för tidigt. Den höga belastning som karpal- och metakarpophalangeallederna utsätts för leder ofta till överbelastning med inflammation som följd. Inflammationen resulterar i nedbrytning av bindväven hos strukturer som innefattar leden; ledbrosk, ledkapsel, underliggande ben och ligament. Men då kliniska symtom uppkommer är sjukdomen ofta långt gången och kronisk. Samtidigt finns det idag ingen farmakologisk behandling som läker av sjukdomen.

Denna litteraturstudie syftar till att undersöka om man kan monitorera träningens effekter på ledbrosket genom att mäta produkter av nedbrytning och syntes av dessa strukturer, så kallade biomarkörer, i ledvätska och serum. Samt slutligen undersöka huruvida träningen av dessa hästar påverkar risken för att de ska drabbas av OA.

Leden består av ett antal olika vävnader, som alla är viktiga för dess funktion och för utvecklingen av OA. Ledkapsel, synovialmembran och ledvätska, ledbrosk och det subkondrala benet, består alla av olika komponenter och påverkas olika vid sjukdom eller skada.

Etiologin bakom OA är inte helt kartlagd, men det är troligt att det finns många faktorer som kan orsaka den lågradiga inflammatoriska process som ligger bakom skadorna som förknippas med den. Oavsett var och varför processen startade, är slutstadiet för OA detsamma: uppfibrillering och degradering av ledbrosket, skleros av och cystor i det subkondrala benet, bildning av osteofyter (kalcifierade pålagringar), degeneration av ligament och synovit och hypertrofi av ledkapseln.

Biomarkörer som associeras med OA och som har visats öka efter hård träning är t.ex. olika inflammatoriska mediatorer som prostaglandin E₂ (PGE₂), IL-1, TNF och kväveoxid (NO), matrix metalloproteinaser (MMPs), degradationsprodukter av kondroitinsulfat (CS), GAGs och kollagen typ II (CTX-II) samt fragment av cartilage oligomeric matrix protein (COMP). Biomarkörerna kan kvantifieras i blodserum och/eller ledvätska och kan ge indikationer på hur ledbrosket affekteras av träning.

Avslutningsvis har flera källor visat att det bästa för hästars ledhälsa verkar vara då de får röra sig fritt på bete dagligen och tränas måttligt i inte allt för högt tempo. Man kan då diskutera det etiska i användningen av hästarna på ett sådant vis att de regelbundet överbelastar sina leder och ofta drabbas av skador och ledsjukdomar, till ingen annan nytta än människors nöje. Men mer studier kring träningens tidiga påverkan på hästarnas ledhälsa hade varit önskvärt.

SUMMARY

Osteoarthritis (OA) in horses is one of the most common reason why horses used for racing and other sports have to get an early retirement. The high strain that carpal- and metacarpophalangeal joints are subjected to leads to abnormal compression which starts the inflammatory process resulting in degradation and alterations of the components constructing the organ. When clinical symptoms appear the disease is often far gone and chronic and today there are no pharmacological treatments that can heal the affected joint.

This literature review aims to investigate if it is possible to monitor the effects of training by measuring biomarkers in serum and synovial fluid and eventually investigate whether training of these horses effects the risk of them developing OA.

The joint is comprised of several different types of tissues, that all are important for the function of the organ and the development of OA. The joint capsule, the synovial membrane that produces the synovial fluid, the articular cartilage and the subchondral bone are constructed with different components that all react differently to damage or disease.

The etiology behind OA is not entirely clear, but it is likely that there are many factors which can cause the low grade inflammatory process that is the reason for the damage associated with the disease. Whatever the cause is, the end-stage of OA is the same: fibrillation and degradation of the articular cartilage, sclerosis and cyst formation in the subchondral bone, formation of osteophytes, synovitis, degeneration of ligaments and hypertrophy of the capsule and degrading of the synovial fluid.

Biomarkers that are associated with OA, and that has been shown to increase after a strenuous exercise are a number of inflammatory mediators such as prostaglandin E2 (PGE2), IL-1, TNF and nitrogen oxide (NO), matrix metalloproteinases (MMPs), degradation products of chondroitin sulphate (CS), GAGs and collagen type II (CTX-II) as well as cartilage oligomeric matrix protein (COMP). They can be quantified in blood plasma and synovial fluid and provides an indication on how the articular cartilage is affected by training.

Multipel sources has shown that the best for maintaing horses joint health is to let them exercise freely at pasture and to be trained moderately in not to high pace. It can be further discussed the ethical aspect of people using horses in such a way that they regularly overloads their joints, resulting in damages and disease – to no other use than peoples entertainment. But more studies would be desired that investigates the early effects that training has on the joint health.

INLEDNING

Osteoartrit (OA) hos häst är ett stort problem inom träning och tävling och är en vanlig orsak till att hästar måste pensioneras i förtid (Baccarin, *et al.*, 2014; van Weeren, *et al.*, 2008; Skiöldebrand, *et al.*, 2017). När kliniska symtom uppkommer är sjukdomen ofta långt gånge och kronisk, samtidigt finns det idag inga farmakologiska behandlingar som läker av sjukdomen (Skiöldebrand, *et al.*, 2017).

Denna litteraturstudie syftar till att undersöka om man kan monitorera träningens effekter på ledbrösket genom att mäta biomarkörer i ledvätska och serum. Vilka i så fall? Och påverkar träningen risken att hästen drabbas av OA? Svar på dessa frågor skulle kunna bidra till att motverka uppkomsten av OA hos många hästar vilket skulle påverka både djurvälstånd och de ekonomiska aspekterna kring hästindustrin till det bättre.

I denna studie har fokus lagts på karpal- och metakarpofalangeallederna hos häst, då det är de som utsätts för allra störst belastning och löper störst risk att utveckla OA (Baccarin, *et al.*, 2014). Frambenen bär 55-60% av hästens vikt i vila och det är de som tar emot den största belastningen exempelvis då hästen landar från ett hopp (Dyce, Sack & Wensing 2010).

MATERIAL OCH METODER

De ursprungliga sökningarna utfördes i databaserna PubMed, Google Scholar och AVMA med sökorden: "Training, exercise, biomarkers, osteoarthritis, jointhealth, horse, equine". Studier på andra djurslag än häst exkluderas, förutom för avsnittet om OA då bl.a Reviews delvis baserade på djurslagen mus och människa användes. Då sjukdomen skiljer sig väldigt lite åt mellan djurslagen ansågs de ändå vara relevanta.

För de mer grundläggande delarna, så som hur själva ledens fysiologi och funktion ser ut användes de textböcker/läroböcker på ämnet som används under veterinärutbildningen. Dessa ämnen är väl studerade och den information som återfinns i den uppdaterade tryckta litteraturen är högst aktuell. För att få med nya rön som kan ha kommit användes de nyaste eller näst nyaste upplagorna av dessa böcker.

Inga källor äldre än 20 år användes då mycket har hänt inom detta område och många äldre teorier förkastats eller omarbetats sedan dess. Ansträngningar för att ha källor som är 10 år eller yngre gjordes, men vissa källor som är äldre togs med ändå då innehållet i dem ansågs relevant för denna litteraturstudie.

LITTERATURÖVERSIKT

Ledens fysiologi

Leden är ett helt organ och alla delar är nödvändiga för dess funktion (Billinghurst, *et al.*, 2003; McIlwraith, *et al.*, 2016). Det subkondrala benet är hårt och hållfast men på samma gång så pass poröst och mjukt att det kan fördela det tryck som uppstår vid hög belastning (McIlwraith,

et al., 2016). Ledytorna är beklädda med ett tunt lager hyalint ledbrosk som sviktat och komprimeras då det belastas (Dyce, Sack & Wensing 2010; McIlwraith, *et al.*, 2016). För att underlätta rörelse utan friktion är ledhålan fylld utav ledvätska. Denna har även till uppgift att försörja cellerna i brosket med näring och syre, samt se till att slaggprodukter transporteras bort (Mescher, 2016; Sjaastad, Sand & Hove 2016). Vätskan produceras av synoviocyterna i synovialmembranet, som avgränsar ledhålan. Ledkapseln och de ligament som ligger utanpå håller ihop leden och förhindrar rörelser i fel plan (Dyce, Sack & Wensing 2010; Mescher, 2016; Sjaastad, Sand & Hove 2016).

Ledkapseln

Den yttre delen av ledkapseln och de ligament som håller samman leden består av tät, regelbunden bindväv som framför allt utgörs av kollagen typ I och elastiska fibrer (Mescher, 2016; Sjaastad, Sand & Hove 2016; McIlwraith, *et al.*, 2016)). Det inre lagret, synovialmembranet, är ett tunt cellrikt membran bestående av lucker bindväv och synoviocyter, som står för produktionen av hyaluronsyra (HA=hyaluronic acid) (Mescher, 2016; McIlwraith, *et al.*, 2016). Detta lager är även rikt vaskulariserat av fenestrerade kapillärer som tillsammans med det genomsläppliga synovialmembranet tillåter genomströmning och utbyte av ämnen med ledvätska. I ledkapseln återfinns även många proprioceptiva nervändar som ger hjärnan information om ledens position (McIlwraith, *et al.*, 2016).

Ledvätskan

Synovialmembranets genomsläpplighet tillåter ett kontinuerligt vätskeutbyte med blod och lymfa och det är plasma från blodet som utgör basen för ledvätska (McIlwraith, *et al.*, 2016). Genom lymfkärl kommer slaggprodukter från vätskan filtreras ut (Sjaastad, Sand & Hove 2016).

Förutom plasma från blodet innehåller ledvätska även andra komponenter, däribland högmolekylärt HA som produceras av synoviocyterna. Denna molekyl ger vätskan en högre viskositet än plasma, vilket är bra för dess smörjande funktion av ledbrosket och minskar på så sätt friktionen mellan ledytorna (Mescher, 2016; McIlwraith, *et al.*, 2016; Sjaastad, Sand & Hove, 2016).

Volymen av ledvätska i en frisk led är relativt liten, men 20-40 mL har kunnat aspireras från de större lederna hos häst och ko. Störst volym har funnits hos djur som får röra sig fritt (Dyce, Sack & Wensing, 2010).

Subkondralt ben

Det subkondrala benet är kompakt i det yttersta lagret, innanför detta är benet poröst och spongiformt. Denna uppbyggnad gör benet starkt och ger bra stöd till leden, medan det på samma gång är lite mjukt och elastiskt (McIlwraith, *et al.*, 2016). Vid regelbunden belastning svarar benet genom att förändra sin morfologi så att lagret med kompakt ben blir tjockare (McIlwraith, *et al.*, 2016).

Det kompakta benet är tjockast där belastningen är som störst och är tunnare perifert, detta beror på att aktiviteten av osteoklaster och osteoblaster påverkas av ämnen som frisätts vid mekanisk belastning (McIlwraith, *et al.*, 2016). I de tunna områdena av det kompakta benet finns få osteoner med blodkärl medan det finns betydligt fler i de tjockare områdena, dessa är således väl blodförsörjda och innerverade. Det innebär att den metabola aktiviteten i ben är betydligt högre än den för brosk (McIlwraith, *et al.*, 2016).

Ledbrosk

Ledbrosket i synoviallederna är av hyalin typ och består främst utav kollagen typ II och vatten (Mescher, 2016; McIlwraith, *et al.*, 2016). Det adulta ledbrosket har inga blodkärl eller nervändar, så närings- och syretillförsel sker genom att vätska med restprodukter pressas ur brosket då det belastas och då belastningen avtar strömmar vätskan åter in och tar näring från blodet med sig (Goldring, *et al.*, 2011; Sjaastad, Sand & Hove, 2016; McIlwraith, *et al.*, 2016). Denna effekt är även vad som ger brosket sin stötdämpande effekt, dock ej vid för snabba rörelser då denna effekt är långsam (Sjaastad, Sand & Hove, 2016).

Brosket kan delas in i fyra lager:

- Det ytliga lagret innehåller tillplattade kondrocyter, tätt packade fibriller av kollagen typ II som ligger parallellt mot ytan, en liten mängd proteoglykaner (PG) samt hög vattenhalt (Blaney Davidson, *et al.*, 2007; McIlwraith, *et al.*, 2016).
- Det intermediära lagret har en lägre vattenhalt, mer PGs och mindre kollagen. Kondrocyterna här är runda och oregelbundet utspridda (McIlwraith, *et al.*, 2016).
- Det djupa lagret har minst kollagen och vatten men mest PG av de fyra lagren. Kondrocyterna är ordnade i kolumner vinkelrätt mot det subkondrala benet och de kollagena fibrerna likaså (Blaney Davidson, *et al.*, 2007).
- Det kalcifierade lagret sitter hårt fast i det subkondrala benet, det blir sedan mer fibröst och mindre kalcifierat perifert, där det går ihop med periostiet och ledkapseln (Dyce, Sack & Wensing, 2010).
- Mellan det djupa och det kalcifierade lagret finns ett tunt lager som kallas tidemark, det har dock visats gå hela vägen ner till det subkondrala benet på vissa platser (McIlwraith, *et al.*, 2016).

Brosk består till stora delar av extracellulär matrix (ECM) som domineras av grundsubstans och olika proteiner; främst kollagen typ II och elastiska fibrer. (Mescher, 2016). De celler som förekommer i frisk broskvävnad, kondrocyterna, utgör ca 3% av broskets totala volym (Sjaastad, Sand & Hove 2016).

Grundsubstansen har många funktioner, bland annat att tillåta diffusion av ämnen till och från celler, så att dessa kan göra sig av med slaggprodukter och ta upp näringsämnen och syre som kommer med blodet. Vattnet i grundsubstansen är bundet till GAGs som i sin tur är bundet till proteoglykaner (Mescher, 2016).

Proteoglykaner (PGs) består av proteinkärnor, till vilka GAGs binder. En av dessa är kondroitinsulfat (CS) (Baccarin, *et al.* 2014). Bland proteoglykanerna är aggrecan en av de mest

studerade, den största och även den som finns till störst mängd i ledbrösket (Mescher, 2016; McIlwraith, *et al.*, 2016). Den har både kondroitin- och keratansulfat bundna till sig och är en viktig beståndsdel i ledbrösket (Mescher, 2016; Sjaastad, Sand & Hove 2016). Både proteinkärnan och sidokedjorna hos aggregaten tenderar att bli kortare allt eftersom djuret blir äldre, vilket påverkar broskets egenskaper (McIlwraith, *et al.*, 2016).

Kollagen typ II ger brosket sin hållfasthet och kan jämföras med armeringen i betong (McIlwraith, *et al.*, 2016). Proteinet är uppbyggt av tre identiska α -1 prokollagen kedjor som är tvinnade i en högervriden trippelhelix. För detta krävs att kollagenaser klyver av en propeptid som intracellulärt fästs i båda ändar av proteinet. Tvärbindningar mellan de kollagena fibrillerna ger större och mer hållfasta fibrer (Billinghurst, *et al.*, 2003; McIlwraith, *et al.*, 2016).

De kollagena fibrerna utgår från det kalcifierade lagret, i det intermediära lagret börjar de böja sig för att sedan vara vinkelräta mot det subkondrala benet i det ytliga lagret. Denna strukturering utvecklas då djuret är väldigt ungt och initieras av mekanisk belastning (McIlwraith, *et al.*, 2016).

Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) hör till trombospondinfamiljen och består av 5 identiska subenheter och binder till komponenter i ECM (McIlwraith, *et al.*, 2016; Skiöldebrand *et al.*, 2017). COMP är framför allt viktig vid bildning av fibrer av kollagen typ II då den hjälper till att föra de ingående molekylerna närmare varandra och underlättar tvärbindning (Heinegård, 2009; Skiöldebrand *et al.*, 2017).

Remodellering

Brosket genomgår en konstant remodellering genom nedbrytning och uppbyggnad av vävnadskomponenter, om än långsammare än andra vävnader (McIlwraith, *et al.*, 2016). Tiden för att byta ut de olika komponenterna skiljer sig: exempelvis kan utbytning av PG ta mellan 300 och 1800 dagar medan det kan ta upp till 20 år för aggregaten att bytas ut (McGavin & Zachary, 2007; van Weeren, *et al.*, 2008). Kollagen typ II tar ännu längre tid att byta ut, total omvandling av alla kollagena fibrer i ledbrösket skulle ta upp till 350 år (McIlwraith, *et al.*, 2016). Detta innebär att skadat brosk ej läker helt, utan istället byts ut av fibrös bindväv vid skada (McGavin & Zachary, 2007).

Nedbrytning av kollagen sker genom kollagenaser, så kallade matrix metalloproteinaser (MMPs). MMP-13 är mest effektiv när det gäller nedbrytning av kollagen typ II. Interleukin-1 (IL-1) är en cytokin som driver utvecklingen av OA och som ökar frisättningen av MMPs (Goldring, *et al.*, 2011; McIlwraith, *et al.*, 2016).

Även aggregaten kan brytas ner av MMPs, men olika typer hos olika djurslag (McIlwraith, *et al.*, 2016). Framför allt dominerad av aggregatanaser som hör till familjen "a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs" (ADAMTS) 4 och 5 (Skiöldebrand, *et al.*, 2017; Troeberg & Nagase 2012).

MMP-aktiviteten i ledbrsket regleras på tre olika vis: påverkan på transkription, påverkan på omvandlingen av inaktiv proform till aktiv form via cytokiner eller då aktiva MMP bildar kluster med s.k tissue inhibitors of MMP (TIMP) och således inaktiveras (McIlwraith, *et al.*, 2016). Vissa stimuli kan dock lösa upp de bindningar som håller samman klustret och återaktivera MMPs. De två senare mekanismerna är en förklaring till varför nivåerna av MMP hastigt stiger i brosk som utsatts för ett trauma eller inflammation (McIlwraith, *et al.*, 2016).

Balansen av cytokiner och tillväxtfaktorer i brosket, den så kallade vävnadshomeostasen, är viktigt för upprätthållandet av frisk vävnad. Tillväxtfaktorer med en känd anabol effekt i ledbrsk inkluderar tranledvätskaorming growth factor- β (TGF- β) och insulin-like growth factor-1 (IGF-1). TGF- β stimulerar syntes av PG och kollagen typ II, men även formationen av osteofyter. IGF-1 stimulerar matrixproduktion och hämmar degradering och är således viktig för homeostasen (McIlwraith, *et al.*, 2016).

Osteoartrit

Osteoartrit (OA) är en kronisk lågradig inflammatorisk sjukdom som påverkar hela leden och alla dess strukturer (Robinson, *et al.*, 2016; Skiöldebrand, *et al.*, 2017). Sjukdomens etiologi är inte helt klarlagd och det är sannolikt att OA är en samling av sjukdomsprocesser som alla har samma slutresultat (Blaney Davidson, *et al.*, 2007; Goldring, *et al.*, 2011; McGavin *et al.*, 2007). Men abnormal belastning på en normal led, eller normal belastning på en abnormal led anses som de två stora grundorsakerna (Goldring & Goldring, 2007; Goldring, *et al.*, 2011).

Kondrocyter och synoviocyter producerar eller överproducerar inflammatoriska mediatorer som IL-1 β , tumour nekrosis faktor (TNF) och kväveoxid (NO), prostaglandin E2 (PGE2), IL-6 och MMPs som stimulerar katabolism och hämmar anabolism av ledbrsket (Goldring & Goldring, 2007; Robinson, *et al.* 2016). Däremot så finns signifikant lägre nivåer TGF- β i ledbrsket hos en OA-drabbad led än i en frisk led (Blaney Davidson, *et al.*, 2007).

Tidigt i utvecklingen av OA kan en ökad syntes av matrixmolekyler observeras, detta betraktas som ett försök att regenerera eller läka den skadade vävnaden. Ytterligare ses en cellsvullnad och ett ödem i vävnaden. Nedbrytningen går dock snabbare än uppbyggnaden och slutresultatet blir ändå en förlust av matrixmolekyler (Blaney Davidson, *et al.*, 2007; Goldring & Goldring 2007).

Oavsett var i leden sjukdomen initieras leder den ofta till samma slutstadium: fibrillation och degradering av ledbrsket, skleros av och cystor i det subkondrala benet, bildning av osteofyter, synovit och capsulit, degeneration av ligament och hypertrofi av ledkapseln samt förtunnad ledvätska (Blaney Davidson, *et al.*, 2007; Goldring, *et al.*, 2011; Robinson, *et al.* 2016; Skiöldebrand, *et al.*, 2017).

Biomarkörer

Biomarkörer kan användas som indikatorer på förändringar i homeostasen i leden, både fysiologiskt och vid sjukdom. Torra biomarkörer inkluderar bilddiagnostik, frågeformulär och

data från visuella analoga skalor (som smärtskalor). Våta biomarkörer mäts i olika kroppsvätskor (serum, ledvätska, urin och direkt i vävnader), de inkluderar t.ex. genetiska markörer och biokemiska molekyler (proteiner/proteinfragment, kolhydrater, peptider, metaboliter osv) (McIlwraith, *et al.*, 2016).

Både makromolekyler och fragment kan frisättas i ledvätska som ett resultat på anabola och katabola reaktioner i brosket (Skiöldebrand, *et al.*, 2006). Eftersom OA leder till nedbrytning av ledbrosket är markörer som visar på denna typ av aktivitet relevanta. Då ökad syntes av matrixproteiner tidigt sjukdomsstadiet är vanligt kan även syntesprodukter användas som biomarkörer för OA (Goldring & Goldring 2007).

Aggrekan

Nedbrytning av aggrekan sker tidigt i OA genom aggrekanaser, framför allt ADAMTS- 4 och 5 (Skiöldebrand, *et al.*, 2017; Troeberg & Nagase 2012). Hos människa har man sett att aggrekan klyvs vid bindningen mellan aminosyrorna asparagin och fenylalanin i friskt brosk, men mellan glutaminsyra och alanin i OA-drabbat brosk (Troeberg & Nagase 2012).

Syntes av aggrekan kan monitoreras genom att kolla efter klyvningsprodukten CS846 i serum. En ELISA med monoklonala antikroppar från mus som även validerats för häst har använts i en studie för att mäta effekten av träning på vävnadsomvandlingen hos föl (Billinghurst, *et al.*, 2003).

Man kan även mäta hela aggrekanmolekyler i ledvätska och serum som ett sätt att monitorera vad som syntetiseras av kondrocyterna i ledbrosket. En kompetitiv ELISA med polyklonala antikroppar från kanin har använts i vissa studier (Tabell 1) för att mäta förekomsten av dessa molekyler (Skiöldebrand *et al.* 2006; McIlwraith, *et al.*, 2016).

Kollagen

Nedbrytning av kollagen är ett kännemärke för OA men det sker först efter att aggrekan brutits ner, då närvaron av aggrekan skyddar kollagen från degradering (Troeberg & Nagase 2012). Eftersom kollagen tar så lång tid att producera betraktas nedbrytning av dessa molekyler som irreversibel. MMP-13 är den främsta kollagenasen vid OA (McIlwraith, *et al.*, 2016; Troeberg & Nagase 2012).

Carboxy-terminal telopeptidfragment från kollagen typ II (CTX-II) är en degraderingsprodukt i ledbrosket från kollagen typ II (McIlwraith, *et al.*, 2016). För att mäta nivåerna i ledvätska och serum har det i vissa studier använts en särskild ELISA (Billinghurst, *et al.*, 2003; Cleary, *et al.* 2010; Jackson, *et al.*, 2015; Skiöldebrand, *et al.*, 2006).

C2C är en särskild neoepitop som uppstår då kollagenas bryter ner kollagen typ II, det är således ännu en biomarkör för nedbrytning av kollagen (Jackson, *et al.*, 2015).

Carboxy-terminal propeptid av kollagen typ II (CPII) är en syntesprodukt av kollagen typ II, det är den propeptid som klyvs av från prokollagena fibriller då de kommer ut i ECM för att de ska kunna bilda trippelhelixar och de går att mäta i serum och ledvätska. Billinghamurst m.fl (2003) använde för sin studie en ELISA med polyklonala antikroppar från kanin som validerats för häst för att mäta förekomsten av dessa molekyler i serum hos 43 föl satta i grupper med olika träningsregim (Billinghurst, *et al.*, 2003).

COMP

För att mäta förekomsten av hela COMP-molekyler i LEDVÄTSKA kan en kompetitiv ELISA med polyklonala antikroppar mot bovin COMP användas, detta gjordes i två studier (Tabell 1) som undersökte förekomsten av COMP (Helal, *et al.*, 2007; Skiöldebrand *et al.* 2006).

En nyare studie av Skiöldebrand m.fl (2017) har istället för hela COMP-molekyler fokuserat på ett specifikt fragment (neoepitop) som visats förekomma enbart vid patologiska processer. De använde polyklonala antikroppar från kanin för att ta fram antikroppar som reagerade på fragmentet av COMP-molekylen i ledvätska från 4 grupper med varierande grad av OA. Därefter utvecklades en kompetitiv ELISA för att mäta förekomsten av dessa neoepitoper.

Sent vid OA, då inflammationen pågått länge, kommer nivåerna COMP och fragment från dessa i ledvätska vara lägre som ett resultat av den långt gångna degraderingen av ledbrusket och en minskad syntes av COMP som ses vid måttlig OA (Skiöldebrand, *et al.*, 2017).

Träning

Regelbunden belastning av ledbrusk inducerar förändringar i kondrocyternas biomekaniska miljö (McIlwraith, *et al.*, 2016). Det är särskilt viktigt för den unga hästen, då ECM i brosket fortfarande håller på att bildas. Kompositionen som brosket har under utvecklingen kommer påverka broskets sammansättning under resten av hästens liv (van Weeren, *et al.*, 2008). Vid normal belastning man har kunnat se ökning av proteoglykanmetabolism vid träning, vilket resulterar i mer PGs och till och med en liten ökning av ledbruskets tjocklek (McIlwraith, *et al.*, 2016).

Överbelastning däremot resulterar i deformation av både cellerna och dess kärnor, vilket ger upphov till cellulär respons som inducerar inflammationen och bildandet av proteaser som bryter ner matrix (McIlwraith, *et al.*, 2016; Troeberg & Nagase 2012). Indirekt kommer förändringarna i det hydrostatiska trycket, osmolariteten och flödet av interstitiell vätska uppkomma. Dessa förändringar kommer påverka cellernas näringledvätskaörsörjning och bortförsel av restprodukter och kan även stimulera aktivering av t.ex. TGF- β vilket sätter igång en inflammation (McIlwraith, *et al.*, 2016; Sjaastad, Sand & Hove 2016).

Aggrekan

En studie på föl visade att koncentrationen GAGs och kollagen i ledbrusket var lägre hos de som fått extra träning utöver vad de rörde sig ute på betet (Tabell 1). Speciellt fanns dessa skillnader i delar av brosket som utsätts för störst belastning (van Weeren, *et al.*, 2008).

I en studie av Frisbie m.fl (2008) visades träning inducera en signifikant ökning av bland annat CS846, CPII, GAG och C2C i ledvätska (Tabell 1). I leder där man inducerat OA såg man signifikant högre nivåer av alla de mätta biomarkörerna, samt PGE2, jämfört med den friska motsvarande leden hos samma häst (Frisbie, *et al.*, 2008).

Även Baccarin m.fl (2014) fann i sin observationsstudie på polohästar under tävlingssäsongen ett samband mellan träning och ledhälsa (Tabell 1). De såg att PGE2 steg under de första 3-6 timmarna efter en match och återgick sedan till normala värden. Ökning av proteinkoncentrationen och en tidig ökning av HA kunde observeras. Detta tolkade de som en anpassning till träningen och belastningen lederna utsattes för (Baccarin, *et al.*, 2014). Tre hästar visade upp markant ökade nivåer av CS i ledvätska, dessa hästar drabbades senare av OA (inom 24 månader från att studien avslutades) (Baccarin, *et al.*, 2014).

Kollagen

En studie visade att koncentrationen av CTX-II i ledvätska steg hos både unga friska hästar som tränas och hos äldre hästar med osteokondrala fragment de fått av tävling eller träning (Tabell 1). Nivåerna var signifikant högre hos hästarna med ledsador än de utan (Cleary, *et al.*, 2010).

Billinghurst m.fl (2003) utförde en studie på 43 föl varav en grupp utsattes för ansträngande träning under de första 5 månaderna *post partum*, en grupp spenderade denna tid inne i en box och en grupp fick gå fritt på bete. Resultatet av deras studie visade att CPII var signifikant lägre i serum hos föl som utsatts för extra träning, jämfört med de som stått på bete (Tabell 1). Även föl som påtvingats boxvila hade lägre nivåer än de föl som fått röra sig fritt på bete. Denna skillnad mellan fölen var borta 6 månader efter att de olika träningsregimerna avslutats (Billinghurst, *et al.*, 2003).

COMP

Helal m.fl (2007) kom i sin studie fram till att nivåerna COMP i serum steg som ett direkt resultat av ansträngande träning för att sedan återta normala värden kort därefter, men var högre i slutet av studien än de var i början (Tabell 1). De såg även att ju högre hastighet hästarna tränades i, desto högre blev koncentrationerna av COMP i serum efteråt (Helal, *et al.*, 2007).

I en längre studie av Skiöldebrand m.fl (2006) sågs koncentrationen COMP i ledvätska sjunka hos hästar som under studietiden uppvisat hälta (Tabell 1) och i korrelation till en ökning av dagar som träning pågick samt stigande ålder (Skiöldebrand, *et al.*, 2006).

Ekman m.fl. (2019) kom i sin studie fram till att den tidigare beskrivna COMP-neoepitopen i stort inte påverkades av kortvarig träning. I denna studie observerades initialt en sänkning av koncentrationerna av neoepitopen vid intervallträning, vilka sedan steg till de ursprungliga nivåerna kort efter träningen. Eftersom dessa koncentrationledvätskaörändringar ej höll i sig mer än 1 timme efter träning ansågs de inte signifikant påverkas av träning (Ekman, *et al.*, 2019).

Tabell 1. Sammanställning av resultaten från studierna ovan.

Publikation	Biomarkör	Vävnad	Träning	Ledpatologi	Resultat	Kontroll
van Weeren, et al., 2008	CS, kollagen II	Ledbrosk	På bana	Nej	Sänkning	Betesgrupp
Frisbie et al., 2008	CS846, CPII, C2C, Col CEQ	Ledvätska och serum	Löpband	Inducerad OA i ena leden	Ökning av alla, mest i OA-led	En grupp friska hästar
Jackson, et al., 2015	CS846, CPII, CTX-II, C2C	Serum	På bana	4 kategorier av ledskador	CPII och CS846 lägre än hos kontroll, CTX-II högre	Ja
Baccarin, et al., 2014	CS (hela molekylen)	Ledvätska	Polo	6 st OA efter studien	Ökning hos de med OA	Nej
Cleary, et al., 2010	CTX-II	Ledvätska och serum	Friska: på bana Sjuka: nej	Sjuka: osteokondrala fragment	Ökning, mest hos sjuka	Nej
Billinghurst, et al., 2003	CPII	Serum	Ena gruppen, galopp-sprinter	Predisponerade, men ej sjuka	Sänkning	Betesgrupp
Helal, et al., 2007	COMP	Serum	På bana	Nej	Ökning	Nej
Skiöldebrand, et al., 2006	COMP, aggregat, denaturerad kollagen II	Ledvätska	På bana	Mild hälta hos vissa under studien	COMP och aggregat minskade, kollagen II ökade	Nej

DISKUSSION

Genom att mäta förekomsten av de olika biomarkörerna (GAG, kollagen typ II, samt COMP) i ledvätska och serum har man visat att träning i stor grad påverkar ledhomeostasen. Generellt har man sett att koncentrationerna av biomarkörer som visar på anabola processer sjunker och de för katabola processer stiger vid träning vilket kan vara indikationer på att leden överbelastas.

Frisbie m.fl (2008) kom dock fram till det motsatta: att koncentrationen av syntesmarkörer steg vid träning och var ännu högre i den led som man inducerat OA i (Tabell 1). Vad detta resultat beror på diskuterades inte av författarna till den studien, men som tidigare nämnts kommer man tidigt vid OA se en ökning av syntesmarkörer då vävnaderna försöker reparera (Blaney Davidson, *et al.*, 2007; Goldring & Goldring 2007). Eftersom detta är en inducerad OA, då man mycket snabbare får skador som annars inte ses förrän sjukdomen är långt gånge, kan det påverka vilka biomarkörer som uppkommer. Därmed kanske inte den studien ger en korrekt bild över vilka markörer som påverkas av träning eller hur träningen påverkar sjukdomsprogressionen.

Aggrekan

Produkter från nedbrytning av aggrekan verkar kunna fungera bra som biomarkör för att mäta förekomsten av OA, studier visar på att dessa ser olika ut beroende på om det är sjukt eller friskt brosk (Troeborg & Nagase 2012). Dock har inga studier hittats inför detta arbete som har använt denna biomarkör för att mäta träningens effekt, med eller utan OA som en faktor.

Baccarin m.fl (2014) såg ett samband mellan ökade nivåer CS (hela molekylen) och uppkomst av OA hos polohästar under tränings- och tävlingssäsong (Tabell 1). Frisättning av hela molekylen till ledvätska skulle kunna tyda på en degradering av ledbrosket då CS normalt är bundet till t.ex. aggrekan och inte ska förekomma fritt i ECM i höga koncentrationer (Mescher, 2016; McIlwraith, *et al.*, 2016; Sjaastad, Sand & Hove 2016). Det skulle kunna bidra med en förklaring till varför de kunnat observera att de hästar med högst nivåer CS i ledvätska i slutet på träningsssäsongen drabbats av OA inom 24 månader efter att studien avslutats. Eftersom det bara var tre hästar som uppvisat detta samband kunde inga statistiska bevis fastställas (Baccarin, *et al.*, 2014).

Kollagen

Jackson m.fl (2015) såg i sin studie att nivåerna CPII var lägre hos tävlingshästar i ett tidigt skede av OA jämfört med matchade oskadda kontrollhästar (Tabell 1). Nicholson m.fl (2010) observerade förhöjda nivåer av samma markör hos hästar som drabbats av osteokondrala fragment (Tabell 1). Dessa resultat motsäger inte varandra, utan visar att förekomsten av biomarkören i olika grader av ledsjukdom skiljer sig åt. Detta skulle kunna vara relevant för att tidigt kunna diagnostisera hästar och på så vis förbättra prognosen.

Även Billinghamurst m.fl (2003) undersökte förekomsten av samma syntesprodukt, men på föl som var genetiskt predisponerade för att utveckla OA (Tabell 1). Resultaten från denna studie tyder på att kontinuerlig för hård träning medan brosket fortfarande utvecklas kan leda till ökad risk för sjukdom senare i livet (Billinghurst, *et al.*, 2003). Ett resultat som även redovisades av Skiöldebrand m.fl (2006) . De senare undersökte dock förekomsten av COMP, aggrekan och kollagen typ II i ledvätska (Tabell 1), men slutsatsen var densamma: att hårt ansträngande träning under lång tid hos unga hästar orsakar förändringar i lederna som verkar hämma deras förmåga att öka syntesen av matrixproteiner (Skiöldebrand, *et al.*, 2006).

Frisbie m.fl (2008) undersökte bland annat nivåerna av en biomarkör som de kallar för epitop Col CEQ, som ska visa på nedbrytning av kollagen typ II (Tabell 1). Ingen vidare information om den biomarkören har hittats och inte heller fler studier som undersökt dessa förekomst. Frisbie m.fl ger ingen vidare förklaring till vad det är eller varför den uppkommer.

Vidare har de i den studien jämfört lederna hos samma häst mot varandra, den ena i vilken de inducerat OA och den andra som enbart genomgått artroskopi (Frisbie, *et al.*, 2008). Men en häst som är drabbad av OA i ena leden kommer inte belasta den andra leden normalt och den ”friska” leden borde således påverkas även den. De har dock använt en kontrollgrupp för att motverka missvisande resultat, vilka även de genomgick artroskopi innan studien. Vilket också kan påverka ledhomeostasen och man kan förvänta sig en initiell ökning av vissa molekyler som följd till inflammation och läkning som ingreppet inducerat, detta kan vara en förklaring till varför man har observerat en ökning av både syntes- och degraderingsprodukter (Tabell 1). Induktion av OA kommer dessutom inte ge en korrekt spegling av spontant uppkommen sjukdom, då skadan mycket snabbare blir mer akut än den blir naturligt. Även detta kan förklara ökningen av syntesprodukter.

COMP

Helal m.fl (2007) kom i sin studie fram till att COMP i serum steg som ett resultat av träning under tid, medan Skiöldebrand m.fl (2006) observerat att COMP i ledvätska initialt steg men sedan sjönk i korrelation till träning (Tabell 1). En direkt skillnad mellan studierna var att den först nämnda tog blodprov före varje träning och direkt efter, medan man i den senare nämnda studien lät hästarna vila 2 dagar efter träning innan ledvätska aspirerades. Om högre koncentrationer förekommer i ledvätska direkt efter träning, så är det rimligt att de även ska förekomma högre koncentrationer i blodet då. Sedan rensas ledvätskan på COMP och nivåerna sjunker, men inga svar på varför de skulle fortsätta bli lägre än ursprungsvärdena allt eftersom träningen fortgår har hittats. En möjlig förklaring skulle kunna vara att nedbrytningen av ledbrosket resulterar i allt mindre mängder COMP totalt som kan frisättas i ledvätskan. Att det helt enkelt inte finns så mycket kvar.

Slutsats

Studierna som tagits upp i detta arbete tyder på att träning av hästar i hög grad påverkar nivåerna av de olika biomarkörerna i serum och ledvätska. De visar att överbelastning av lederna hos vuxna hästar, samt påtvingad träning av föl minskar koncentrationerna av syntesprodukter och ökar koncentrationen degraderingsprodukter i serum och ledvätska. Man har studerat förekomsten av både hela molekyler som ingår i ECM, så väl som produkter av nedbrytning och nybildning av dessa för att undersöka träningens effekter på ledbrosket (Tabell 1).

Förekomsten av vissa biomarkörer, speciellt degraderingsprodukter av aggregatan samt neoepitopen av COMP, verkar mer associerade med OA än andra och dessa skulle då kunna vara mer relevanta för att monitorera ledhälsan än övriga (Skiöldebrand, *et al.*, 2017; Troeberg & Nagase 2012). Just dessa biomarkörer verkar inte påverkas av träning och kan då inte bidra till att mäta träningens effekter på homeostasen i ledbrosket. Däremot skulle de kunna bidra till

tidig diagnostisering och eventuell behandling av hästar med OA, vilket skulle vara bra för både djurvälstånd och de ekonomiska aspekterna inom hästsporten (Skiöldebrand, *et al.*, 2017). Med sådana metoder skulle man kanske kunna anpassa träningen efter hästens förutsättningar och kanske helt undvika att symtom uppkommer.

Avslutningsvis har flera källor visat att det bästa för hästars ledhälsa verkar vara då de får röra sig fritt på bete och tränas måttligt i inte allt för högt tempo (Billinghurst, *et al.*, 2003; Dyce, Sack & Wensing 2010; van Weeren, *et al.*, 2008). Man kan då ställa sig frågan om det är lämpligt att hästar används på ett sådant sätt att de regelbundet överbelastas och skadas, till ingen annan nytta än människors nöje.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Baccarin, R.Y.A., Rasera, L., Machado, T.S.L. & Michelacci, Y.M. (2014). Relevance of synovial fluid chondroitin sulphate as a biomarker to monitor polo pony joints. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 78(1): 50-60.
- Billinghurst, R.C., Brama, P.A.J., Knowlton, M.S. & McIlwraith, C.W. (2003). Significant exercise-related changes in biomarkers in the serum levels of two biomarkers of collagen metabolism in young horses. *Osteoarthritis and Cartilage*, 11(10): 760-769.
- Blaney Davidson, E.N, van der Kraan, P.M. & van der Berg, W.B. (2007). TGF- β and osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 15(6): 597-604
- Cleary, O.B., Trumble, T.N., Merrit, K.A. & Brown, M.P. (2010). Effect of exercise and osteochondral injury on synovial fluid and serum concentrations of carboxy-terminal telopeptid fragments of type II collagen in racehorses. *American Journal of Veterinary Research*, 71(1): 33-40.
- Dyce, L.R., Sack, W.O., Wensing C.J.G. (2010). *Textbook of veterinary anatomy*. 4:e uppl. St. Louise, Missouri: Saunders, Elsevier Inc.
- Ekman, S., Lindahl, A., Rüetschi, U., Jansson, A., Björkman, K., Abrahamsson-Aurell, K., Björnsdóttir, S., Löfgren, M., Mattsson Hultén, L. & Skiöldebrand, E. (2019). Effect of circadian rhythm, age, training and acute lameness on serum concentrations of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) neo-epitope in horses. *Equine Veterinary Journal*.
- Frisbie, D.D., Al-Sobayil, F., Billinghurst, R.C., Kawcak, C.E. & McIlwraith, C.W. (2008). Changes in synovial fluid and serum biomarkers with exercise and early osteoarthritis in horses. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16(10): 1196-1204.
- Goldring, M. & Goldring, S.R. (2007). Osteoarthritis. *Journal of Cellular Physiology*, 213(3): 626-634.
- Goldring, M.B. & Goldring, S.R. (2010). Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis: Articular cartilage and subchondral bone. *Annals of the New York Academy of Science*, 1192(1): 230-237.
- Goldring, M.B., Otero, M., Plumb, D.A., Dragomir, C., Favero, M., El Hachem, K., Roach, H.I., Olivotto, E., Borzì, R.M. & Marcu, K.B. (2011). Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *European Cells and Materials*, 21: 202-220.
- Heinegård, D. (2009). Proteoglycans and more – from molecules to biology. *International Journal of Biology and Experimental Pathology*, 90: 575-586
- Helal, I.E., Misumi, K., Tateno, O., Kodama, T., Ishimaru, M., Yamamoto, J., Miyakoshi, D. & Fujuki, M. (2007). Effect of exercise on serum concentration of cartilage oligomeric matrix protein in Thoroughbreds. *American Journal of Veterinary Research*, 68(2): 134-140.

Jackson, B.F., Reed, S.R., Price, J.S. & Verheyen, K.L. (2015). Relationships between serum biomarkers of cartilage and bone metabolism and joint injury in young Thoroughbred racehorses in training. *American Journal of Veterinary Research*, 76(8): 679-687

McGavin, M.D. & Zachary, J.F. (2007). *Pathologic basis of veterinary disease*. 4:e uppl. St. Louise, Missouri: Saunders, Elsevier Inc.

McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Kawcak, C.E. & van Weeren, P.R. (2016). *Joint Disease in the Horse*. 2:a uppl. St. Louise, Missouri: Saunders, Elsevier Inc.

Mescher, A.L. (2016). *Junqueira's Basic Histologi*. 14:e uppl. New York: McGraw-Hill Education

Nicholson, A.M., Trumble, T.N., Merritt, K.A. & Brown, M.P. (2010). Associations of horse age, joint type, and osteochondral injury with serum and synovial fluid concentrations and type II collagen biomarkers in Thoroughbreds. *American Journal of Veterinary Research*, 71(7): 741-749

Robinson, W.H., Lepus, C.M., Wang, Q., Raghu, H., Mao, R., Lindstrom, T.M. & Sokolove, J. (2016). Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 12(10): 580-592

Sjaastad, Ø.V., Sand, O. & Hove, K. (2016). *Physiology of domestic animals*. 3:e uppl. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.

Skiöldebrand, E., Ekman, S., Mattsson Hultén, L., Svala, E., Björkman, K., Lindahl, A., Lundqvist, A., Önnérfjord, P., Sihlbom, C. & Rüetschi, U. (2017). Cartilage oligomeric matrix protein neoepitope in the synovial fluid of horses with acute lameness: A new biomarker for the early stages of osteoarthritis. *Equine Veterinary Journal*, 49(5): 662-667.

Skiöldebrand, E., Heinegård, D., Olofsson, B., Rucklidge, G., Ronéus, N. & Ekman, S. (2006). Altered homeostasis of extracellular matrix proteins in joints of standardbred trotters during a long-term training programme. *Journal of Veterinary Medicine, series A*, 53(9): 445-449.

Troeberg, L., Nagase, H. (2012). Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1824: 133-145.

van Weeren, P.R., Firth, E.C., Brommer, H., Hyttinen, M.M., Helminen, H.J., Rogers, C.W., DeGroot, J. & Brama, P.A.J. (2008). Early exercises advances the maturation of glycosaminoglycans and collagen in the extracellular matrix of articular cartilage in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 40(2): 128-135.